

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-510665

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)12月1日

| | | | |
|----------------------------------|-------|----------------|-----|
| (51) Int.Cl. ⁹ | 識別記号 | 序内整理番号 | F I |
| C 1 2 P 21/02 | | C 8214-4B | |
| A 0 1 K 67/00 | 5 0 1 | 9123-2B | |
| A 6 1 K 31/70 | | 9454-4C | |
| 35/76 | | 7431-4C | |
| | | 9050-4B | |
| | | C 1 2 N 15/ 00 | A |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 8 頁) 最終頁に続く | | | |

(21) 出願番号 特願平5-504587
 (86) (22) 出願日 平成4年(1992)8月20日
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)2月18日
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 2 / 0 7 0 2 9
 (87) 国際公開番号 W O 9 3 / 0 3 7 6 9
 (87) 国際公開日 平成5年(1993)3月4日
 (31) 優先権主張番号 7 4 7 . 3 7 1
 (32) 優先日 1991年8月20日
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)
 (81) 指定国 E P (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, S E), A U, C A, J P

(71) 出願人 アメリカ合衆国
 アメリカ合衆国、20892-9902 メリーランド州、ベセスダ、ナショナル インステ
 イテューツ オヴ ヘルス、オフィス オ
 ヴ テクノロジー トランスファー、ボッ
 クス オーティーティー (番地なし)
 (72) 発明者 クリスタル、ロナルド ジー、
 アメリカ合衆国、20854 メリーランド州、
 ボトマック、キャナル ヴィスタ コート
 13712
 (74) 代理人 弁理士 高島 一

(54) 【発明の名称】 アデノウイルスが介在する胃腸管への遺伝子の輸送

(57) 【要約】

本発明は、一般に、アデノウイルスが介在する胃腸管への遺伝子の輸送に関する。特に、本発明は、組換え、増殖欠損性アデノウイルスが介在する治療遺伝子の輸送方法に関し、この方法により全身および/または局所使用のための治療タンパク質が生産される。

請求の範囲

1. 生物学的に活性なタンパク質をコードするDNA断片を含む増殖欠損性アデノウイルスを、該タンパク質が生産される条件下で個体の胃腸管に投与することを含む、該タンパク質を個体の胃腸管内において生産する方法。
2. 該タンパク質が、治療タンパク質である請求の範囲第1項記載の方法。
3. 該タンパク質が、血液凝固因子、脳下垂体ホルモン、ペプチドホルモン、リンホカイン、サイトカイン、腫瘍抑制タンパク質、血液学的成長因子、レセプターアゴニストおよびレセプターアンタゴニストからなる群より選ばれた請求の範囲第1項記載の方法。
4. 該タンパク質が、 α 1-アンチトリプシン、エリスロポエチン、脳因子、成長ホルモン、腫瘍壊死結合タンパク質、インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト、インターフェロン γ 、インターフェロン α およびインシュリンからなる群より選ばれた請求の範囲第1項記載の方法。
5. 該アデノウイルスが、Ad- α 1ATである請求の範囲第1項記載の方法。
6. 該アデノウイルスが、腸溶性カプセルに入れて投与される請求の範囲第1項記載の方法。
7. 治療タンパク質をコードするDNA断片を含む増殖欠損性アデノウイルスを含有する腸溶性カプセル。
8. 生物学的に活性なタンパク質をコードするDNA断片を含む増殖欠損性アデノウイルスの有効量を、該タンパク質が生産される条件下で動物の胃腸管内に投与することを含む、該タンパク質を動物の胃腸管内において生産する方法。
9. 該動物が、哺乳類、鳥類または魚類である請求の範囲第8項記載の方法。
10. 該動物がブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ネコおよびイヌからなる群より選ばれた請求の範囲第9項記載の方法。
11. 該動物がニワトリである請求の範囲第9項記載の方法。
12. 治療タンパク質をコードする少なくとも一つのDNA断片を含む増殖欠損性アデノウイルスであって、酸耐性および塩基感受性であるベヒクルに含まれた該アデノウイルス、および製薬上許容される希釈剤、担体または賦形剤を含有

明細書

アデノウイルスが介在する胃腸管への遺伝子の輸送

技術分野

本発明は、一般に、アデノウイルスが介在する胃腸管への遺伝子の輸送方法に関する。特に、本発明は、全身および/または局所使用のための治療タンパク質を生産することを目的とする、組換え、増殖欠損性 (replication-deficient) アデノウイルスが介在する胃腸管への治療遺伝子の輸送方法に関する。

背景技術

治療剤としてのタンパク質の使用は、特に胃腸管の生理学的障壁によって制限される。タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、あるいはアミノ酸断片という用語は、ここではペプチド結合を介して結合したアミノ酸の重合体を定義するのに互換的に用いられる。治療タンパク質は、ここでは個体に対して有益なタンパク質として定義される。タンパク質は治療目的のために経口または経直腸投与することはできない。なぜならタンパク質は一般に治療に必要な濃度で、完全な形態で血液循環に到達しないからである (タンパク質が変性され、および/または吸収されない)。従って、治療タンパク質は全身的に、例えば、静脈内、皮下、皮内または筋肉内経路によって投与される。

投与に関するこのような問題は、多くの異なる治療タンパク質 (これらのタンパク質は全て全身系で投与されなければならないのだが) を生産することが可能な組換えDNA技術の発達によって劇的に増した。これは短期間の使用には重大な問題ではないかもしれないが、長期間の使用 (組換えタンパク質の殆どにおいて典型的な使用法である) では、投与経路に付随するあらゆる問題 (例えば、利用可能な静脈、不快感およびコストの問題) を伴う長期間の全身投与が必要となる。

組換えアデノウイルスは、in vivo でヒトタンパク質を生産するのに使用できることが知られている (例えば、肝臓に通じる門静脈内、および肺に通じる気管

する血管組成物)。

13. タンパク質をコードするDNA断片を含む 増殖欠損性アデノウイルスの有効量を、該タンパク質が生産され、かつ該タンパク質に対する免疫を生起させる条件下で動物の胃腸管内に投与することを含む、タンパク質に対する免疫を動物に生起させる方法。

内への組換えアデノウイルスの投与が含まれる)。ここに記載する全ての刊行物はその全体が参考のためここに包含される (Rosenfeld M et al. (1991) *Science* 252 : 431-434 ; Jaffe HA et al. (1991) *Clin Res* 39 (2) 302 A ; Rosenfeld MA et al. (1991) *Clin Res* 39 (2) : 311 A参照)。しかしながら、これらの方法はすべて、組換え遺伝子の腸管外投与 (すなわち、静脈内、門脈内、気管内投与) を要するから組換えタンパク質の全身投与に実用的でない。

本発明は、治療タンパク質の遺伝子コード配列を含む、組換え、増殖欠損性アデノウイルスを用いて胃腸管の管腔細胞 (lining cell) へ遺伝子を挿入し、その部位を用いて治療タンパク質を生産し、それを全身的使用に利用できる血液循環内へ分泌することにより、経腸経路で治療タンパク質を投与する方法を提供することによって上記の問題を解決する。あるいは、同様の方法は胃腸管の管腔内の局所治療用として、あるいは胃腸管壁の細胞内または細胞外マトリックスにおける使用のために、胃腸管内へタンパク質を分泌するのに使用することができる。

1960年代の研究では、(胃内での不活性化を避けるために) 腸溶性被覆カプセルに生きたアデノウイルスを入れ、ヒトに経口で投与するとアデノウイルスに対する全身性免疫ができることが示されている (Chanock RM et al. (1966) *JAMA* 195 : 151-158)。これは今や米国における陸軍新兵のためのアデノウイルスに対する標準的な免疫方法である。この免疫ストラテジーの基礎となる概念は、カプセルが腸管の管腔内で溶解するとアデノウイルスがカプセルから離れ、腸上皮細胞を感染させ、上皮細胞内で増殖し、新しく増殖したウイルスが免疫系に現れ、その結果アデノウイルスに対する全身性免疫ができるというものである。

既に、アデノウイルスを増殖欠損性となるように (すなわち、標的細胞に感染した後、新しいウイルスの生産を指示しない)、また新しい遺伝子 (例えば、治療に有益な遺伝子のコード配列) を含むように変性し得ることが実際に行われされている。アデノウイルスゲノムのE1a領域の初期プロモーター (EP) の直接制御下に組換えDNA挿入物を使用することは、パスツール研究所のM. Perricaudet, et al. によって欧州特許出願No.0185573 (1986年6月25日公開) に記載されている。このような変性ウイルスは組換え遺伝子を標的細胞にin vivo で輸送

するのに使用することができる【例えば、Rosenfeld M et al. (1991) Science 252: 431-434; Berkner KL (1988) BioTechniques 6: 616-629 照】。

発明の要約

患者の胃腸管の細胞内でタンパク質を生産させる方法を提供することが、本発明の全般的な目的である。

患者の胃腸管の細胞内でタンパク質を生産させる方法を提供することが、本発明の特定の目的である。本方法は、タンパク質をコードするDNA断片を含む増殖欠損性アデノウイルスを、該タンパク質が生産される条件下で患者の胃腸管に投与することからなる。組換えアデノウイルスに入れられる特定の配列に基づいて、タンパク質が好ましくは全身治療のために血液循環へ、局所治療のために胃腸管の管腔へ、あるいはその両方に分泌される。さらに、組換えアデノウイルスの設計は好ましくは、使用するタンパク質が胃腸管の細胞内または胃腸管の腔内に送達されるようにする。

本発明のさらなる目的および利点は以下の記載から明確となるだろう。

図面の簡単な説明

図1：組換えアデノウイルス(A d)ベクター。上段-E1 a、E1 b [マップユニット(mu) 1.3-11.2; 100 mu = 36kb] およびE3 (mu 76.6-86.0)領域を示す野性型A d 5ゲノム。

図2：結腸壁の解剖図および組換えアデノウイルスA d- α 1 AT (A T C C C C L 2 4 8) で変性したT 8 4 ヒト結腸癌腫上皮細胞によって生産された α -1 アンチトリプシンの分泌の極性を評価するために使用した培養上皮細胞モデル。

A. 上皮細胞(14)、結腸の管腔(13)、管腔に隣接する上皮の先端面(12)、粘膜下組織に隣接する上皮の基底外側面(11)を示す結腸の断面図、および毛細管(19)、筋肉層(20)。

B. 微細孔膜(17)、培養細胞(16)、分離された先端(15)および

供する。増殖欠損性アデノウイルスを用いることにより、ウイルスが標的細胞内で増殖することができないのでこの方法は安全である。組換えアデノウイルスを使用することにより、標的細胞はヒト治療タンパク質を生産するようになる。増殖欠損性組換えアデノウイルスによる感染の標的として胃腸管の上皮細胞を選択することによって、本発明は反復的に使用し得る経路により(例えば、上皮細胞内の組換えアデノウイルス感染の慢性度に応じて、毎日、あるいはより少ない頻度で)、容易に投与することを可能にした(好ましくは、腸溶性皮膜カプセルで経口投与する)。

胃腸管の上皮細胞は、組換えアデノウイルスの生産物の一部を感染した上皮細胞の基底外側面を通して分泌するので、本方法は全身への効用を必要とする適用に利用できる。またこれらの上皮細胞は、生産物の一部をその先端面を通して分泌するので、本方法は管腔への効用を必要とする適用(例えば、管腔内胃腸疾患および胃腸癌)に利用できる。組換えアデノウイルスを適切に設計すれば、治療タンパク質は、胃腸管の上皮細胞内または胃腸管腔の局所周辺での治療用(例えば、胃腸管の癌あるいは胃腸管の炎症疾患への適用)に利用できる。

全身的投与を必要とする疾患に対しては、本アプローチは組換えタンパク質を血液循環に投与する簡便で安全な方法を提供する。そのようなタンパク質としては、以下のものが含まれるが、これらに限定されない。

- ・ α 1-アンチトリプシン- α 1-アンチトリプシン欠損症に対して
- ・薬物因子-血友病に対して
- ・他の血液凝固因子-出血疾患に対して
- ・成長ホルモン-成長障害に対して
- ・インシュリン-糖尿病に対して
- ・他のペプチドホルモン
- ・他の脳下垂体ホルモン(副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)および甲状腺刺激ホルモン(TSH)の2例である。)
- ・全身療法に使用するリンホカインおよびサイトカイン
- ・インターフェロン-小児期の肉芽腫性疾患(および説明途中の他の疾患)に

高底外側(18)のコンパートメントを示す上皮細胞培養物のチャンパー。

図3：組換えアデノウイルスA d- α 1 ATにex vivo で接触させたラット結腸によるヒト α -1アンチトリプシン(α 1 AT)のde novo合成と分泌のデモンストレーション。

本発明の詳細な説明

本発明は、胃腸管内における治療タンパク質の生産方法に関する。段階としては、まず最初に、増殖欠損性アデノウイルス(以下、「変性アデノウイルス」という)を治療に有益なタンパク質のコード配列を用いて構築する。例えば、ヒト α 1 AT遺伝子のコード配列を含むアデノウイルスA d- α 1 ATが使用される(図1)ならびにRosenfeld M et al. (1991) Science 252:431-434 参照)。第二に、変性アデノウイルスを腸溶性カプセルに入れる(あるいは代替として、胃を通過するチューブを介して、ウイルスが変性しないよう胃管腔液(stomach lining fluid)を酸性した後、経口でまたはチューブによって胃内へ、または直腸経路で投与する)。代替として、錠剤が十二指腸、空腸、回腸、または結腸の塩基性(pH)環境に到達するまで変性アデノウイルスの遊離と吸収を妨げるために、特別なコーティングをアデノウイルスの施すことも出来る。経口投与にはカプセル錠剤あるいは丸剤が簡便な送達媒体であり、直腸投与には坐剤が好ましい。そして投与が行なわれ、以下の影響が起る。

(1) 胃腸管の細胞(好ましくは上皮細胞)が変性アデノウイルスに感染する。

(2) 変性アデノウイルス配列内の組換え遺伝子が組換えタンパク質の合成を示し、該タンパク質は(組換え遺伝子内の配列の設計のされ方に基づいて)血液循環内、胃腸管の管腔内、あるいは血液循環内、胃腸管の管腔内両方、あるいは胃腸管の上皮細胞内、あるいは胃腸管の腔内の局所周辺に分泌される。

(3) そして治療タンパク質は(血液循環内に分泌されたときは)全身で、あるいは(管腔内へ分泌されたときは)腸内で、胃腸管腔の細胞内および/または細胞外マトリックス内で作用するように利用できる。

本発明は組換えタンパク質のヒトへの実用的で、簡便で、安全な投与方法を提

対して

- ・インターフェロン α -白血癉および慢性活動性肝炎に対して
- ・エリスロポエチン-慢性腎不全および他の骨髄抑制疾患に対して
- ・他の血液学的成長因子-骨髄抑制疾患に対して
- ・例えば、再灌流療法に続いて、特にバルーンカテテル(balloon catheterization)後の冠状動脈内の血性の予防のための組織プラスミノゲンアクチベーターの投与、あるいはヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染に対するCD4の投与、ならびに経期間または長期間いずれかの全身的投与を必要とする他の組換えタンパク質の投与。
- ・セレブロンダーゼ欠損症およびアデノシンデアミナーゼ欠損症のような他の遺伝性疾患に使用する組換えタンパク質
- ・レセプターアゴニストまたはアンタゴニスト-例えば、全身性高血圧の制御のため：敗血症性ショック、慢性閉塞性肺病および他の疾患に使用するインターロイキン-1レセプターアンタゴニスト
- ・サイトカイン、リンホカイン、およびホルモンに対する結合性タンパク質-例えば腫瘍壊死因子が介在するショックおよび炎症性疾患の治療に使用する腫瘍壊死因子結合性タンパク質(腫瘍壊死因子レセプターの一部)

胃腸管の遺伝性ならびに後天性疾患に対して、本方法は胃腸管腔の細胞表面、あるいは細胞内または細胞外マトリックスに組換えタンパク質を投与する手段を提供する。可能な適用例としては、以下のものが含まれる。

- ・悪性性線維症のような脚不全疾患に使用する腫瘍抑制剤
- ・乳糖不耐症に使用するラクターゼおよび小腸ジサッカリダーゼ欠損症に使用する適当な酵素
- ・サイトカイン、腫瘍抑制タンパク質(tumor suppressor proteins) (例えば、p53および網膜芽細胞腫遺伝子)、および細胞毒性タンパク質を用いた胃腸癌に対する局所治療
- ・腫瘍抑制タンパク質(例えば、p53および網膜芽細胞腫遺伝子)を用いた胃

腸管癌(例えば、家族性ポリポー症)になりやすい個体における癌の予防

哺乳類や鳥類(より詳しくは、家畜、例えば、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウマ、イヌ、ネコおよびニワトリ)に対し、本方法は、成長を促進し、商業目的のための特徴を生み出す目的で、および/または一般的な治療目的で、およびヒトが用いうる精製成分からタンパク質を、またヒトタンパク質と反応性のある試薬用の抗体を生産する目的で、組換えタンパク質(例えば、成長ホルモン)をこれらの動物に投与する手段を提供する。

本発明に従って、生物学的に活性なタンパク質の有効量を受容個体に送達するための手段を提供することにより、治療剤としてのタンパク質およびポリペプチドの使用が大いに拡大する。本発明による調製物は、動物-哺乳類(ヒトを含む)、魚類、および鳥類が含まれるがこれらに限られない-に好適に投与される。本調製物は、好ましくは家畜類(ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ等)、家庭用ペット(ネコ、イヌ、カナリア、インコ等)、魚類(特に水槽内や養殖場における、例えば熱帯魚、金魚および他の觀賞用コイ、ナマズ、マス、サケ等)および鳥類、特にニワトリ、カモ、ガチョウ等のような家禽に好適に投与される。

本発明の一態様においては、増殖欠損性アデノウイルスは、動物、たとえば家畜類、家庭用ペット、魚類、家禽等への投与用の無毒性の製剤上許容される個体として作用する動物のエサと共に(あるいは、より少ない投与量にコントロールして、動物用飲料水と共に)用いられる。ひとつには、本態様はヒト血清に対する精製のためのタンパク質を生産するのに、および異なる種、例えばウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、ブタ等においてヒトタンパク質に対する試薬用の抗体を生産するのに有用である。別の面においては、本態様は、タンパク質またはポリペプチドが有用な治療剤である疾患の治療に、特に治療タンパク質をコードする遺伝子がそれによって治療される種由来であるか、または免疫反応を抑制するために近い相同性を有する配列をもつ場合に有用である。

本発明の増殖欠損性アデノウイルスはさらに、慣用の賦形剤、すなわち、ウイルスを劣化させるような反応をおこさない、経腸(例えば経口)投与に適した製

剤上許容される有機あるいは無機担体物質との混合物で使用される。適切な製剤上許容される担体は当分野においてよく知られている。(適切なベヒクルとしては酸溶性で塩基感受性のもの、すなわち、許容されない分解を受けることなく胃を通過して輸送され得る程度に酸溶性で塩基感受性のものが含まれる。)例えば、水、塩溶液、アルコール、アラビアゴム、植物油、ベンジルアルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、乳糖、アミロースあるいはデンプンのような炭水化合物、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘着パラフィン、香油、脂肪酸、モノグリセリドおよびジグリセリド、ペンタエリトリール脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等が挙げられるが、これらに限定されない。増殖欠損性アデノウイルスを殺さないよう適切な注意を払って、調製物を滅菌することができ、所望により活性ウイルスを劣化させるような反応をおこさない補助剤、例えば賦形剤、保存剤、安定化剤、凍結剤、乳化剤、浸透圧に影響を与えるための塩、緩衝液、着色剤、香香料、および/または芳香剤等が混合され得る。例えば、(緩衝剤や塩基によるように)直接的に、あるいは(薬物によるように)間接的か、いずれかで、胃のpHを高めるための薬剤が、ウイルスが害されずにより容易に通過できるようにするために使用される。調製物はまた所望により他の生物学的活性物質、例えばアンチセンスDNAまたはmRNAと併用される。

本発明のもうひとつの態様においては、増殖欠損性アデノウイルスは感染性物質に対する免疫を生起させるワクチンとして使用され得る。そのストラテジーは以下の通りである。免疫を生起させるタンパク質をコードする遺伝子を増殖欠損性アデノウイルスにクローンする。次に目的の遺伝子を含む増殖欠損性アデノウイルスを、本明細書で述べたような動物(好ましくはヒト)に投与する。遺伝子配列は、外来タンパク質に対する免疫ができるように、タンパク質が胃腸管の上皮細胞によって全身循環へ分泌されるように設計されている。

この方法の例には肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、および動物の病気(特にヒトの病気)の原因となる他の全てのウイルスに対する免疫の付与が含まれる。このストラテジーはまた細菌、真菌(カビ)、および他の感染性物質に対す

る免疫を付与するのに使用できる。

本発明の特に興味深い面は、増殖欠損性アデノウイルスを、化学療法剤(アンチセンス化合物を含む)を送達するためのシステムとして使用、特に癌化学療法において使用することを含むことである。従来の化学療法剤との使用は上述した。簡単に言えば、癌内の腫瘍細胞に対するアンチセンス化合物の使用は、第一の薬物学的としてmRNAを、もうひとつのmRNA分子あるいはmRNAに相補的な塩基配列を持つ合成オリゴデオキシヌクレオチド(水素結合された塩基対によるハイブリッド二重鎖を形成する)と共に選択することを包含する。このハイブリダイゼーションは恒定的とするmRNAのタンパク質生産物の発現を阻害し、本工程は「翻訳停止」と呼ばれる。mRNAの阻害は、単一のmRNA分子が多数のタンパク質コピーを生じさせるので、酵素活性部位の阻害より効果的である。よって、細胞機能に必要な遺伝子生産物の発現の選択的阻害は、定義はできないが非常に所望される化学療法の到達点-選択的細胞死を生み出す。このような方法は、例えば、J.S. Cohen, "Antisense Oligonucleotides as an Approach Toward Anti-Aids Therapy", 第195-224頁, Design of Anti-Aids Drugs, E. deClerq (編), Elsevier Publishing Co. (1990); およびS.L. Loke, et al. Current Topics in Microbiology and Immunology 141: 282-289 (1988)のような文献で知られている。

経腸投与には、錠剤、糖衣錠、液剤、ドロップ、坐剤が特に好適であり、あるいは加糖ベヒクルが用いられるカプセル剤、シロップ剤、エリキシル剤なども使用し得る。持続性あるいは制御放出性組成物(例えばリポソーム)または活性ウイルスが、特異的に化学分解されるコーティング(例えば、マイクロカプセル化、多重コーティング等)によって保護されたものに製剤化することができる。また組成物を凍結乾燥し、得られた凍結乾燥物を使用することもできる。

一般に、本発明による調製物は、製剤上許容される担体中に単位投与量あたり 10^4 - 10^{14} pfu/ml、好ましくは約 10^8 - 10^{11} pfu/mlの組換え増殖欠損性アデノウイルスを含む単位投与形態に分配される。本発明により投与される生物学的に活性な化合物の投与量は当分野において一般的に知られているが、本発明により

改良されたデリバリーシステムが提供されるため、しばしばその量が軽減される。

特定の症例において投与される増殖欠損性アデノウイルスの好ましい実用量は、利用される特定のタンパク質またはポリペプチド、製剤化された特定の組成物、投与様式、および治療される特定の部位や生物によって異なる。

使用される特定の調製物は、タンパク質またはポリペプチドの性質、および活性成分の生物学的利用率(すなわち、薬剤がその作用部位に、または薬剤がそこから作用部位に接近する生物学的障壁に到達する程度)を確実にする所望の作用部位に基づき、通常の知識に従って選択される。宿主への投与量は、通常に考慮して、例えば対象薬剤の異なる活性を適例に従って比較することにより、また適当な慣用の薬理学的プロトコールにより決定することができる。

以下の実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例

本発明の実施可能性を示す目的で、ヒト α 1-アンチトリプシンをコードする配列を結腸上皮細胞に輸送するために増殖欠損性組換えアデノウイルスAd- α 1AT(図1)を用いた。次の3つのモデルを使用した。(1)T84細胞結腸癌腫(カルシノーマ)細胞 in vitro; (2)無菌ラット結腸 ex vivo; および(3)コットンラット(cotton rat)結腸 in vivo。

以下のプロトコールおよび実験の詳細は続いて記載する実施例で参照する。

組換えベクター(Ad- α 1AT)は、E8領域の主要部およびAd5の左末端から2.6mbを欠失させ、調節配列および組換えヒト α 1AT遺伝子を含むプラスミドpMLP- α 1ATからの α 1-アンチトリプシン(α 1AT)発現カセットを左末端に付加することにより構築した(図1)。Ad5はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection)、ロッキンビル、メリーランド州、アメリカ合衆国から市販されている。 α 1AT cDNA、発現カセット、および最終のベクターアデノウイルスは、M. Rosenfeld, et al. Science 252:431-434 (1991)に記載の方法を用いて調製した。

図1の下段に $\alpha 1$ A T 発現カセットの図解を示す。I T R は逆向き末反復 (inverted terminal repeat) である。組換えウイルスベクター A d - $\alpha 1$ A T を組換えるために、発現カセットを、A d - d 1 3 2 7 から E 1 a 領域の部分を除くために Cla I プレカットした A d - d 1 3 2 7 D N A と融合した。組換えアデノウイルス D N A を増殖が行われる 2 9 3 細胞株にトランスフェクションし、感染性ウイルス内に包装し、ブランク容器により回収した。□々のブランクを 2 9 3 細胞内の増殖により増殖させ、ウイルス D N A を抽出した。使用する前に組換えウイルスの D N A が完全であることを制限断片分析およびサザンハイブリダイゼーションにより確認した。A d - $\alpha 1$ A T のストックを 2 9 3 細胞中で増殖させ力価を測定した。感染の 3 6 時間後、細胞/尿液を 5 サイクル行なうことによりウイルスを感染細胞から放出させた。C s C l 勾配を用いて A d - $\alpha 1$ A T をさらに精製した (詳細は Rosenfeld M et al. (1991) *Science* 252: 431-434 を参照)。

図 3 A は、組換えアデノウイルス A d - $\alpha 1$ A T に感染させたラット細胞によるヒト $\alpha 1$ - アンチトリプシン ($\alpha 1$ A T) の de novo 合成および分泌のデモンストレーションを示す。細胞を洗浄し、凍結を溶解して長さ 2 ~ 5 cm の「ソーセージ」をつくり、 10^{10} ~ 10^{11} pfu/ml A d - $\alpha 1$ A T (L H C - 8 培養液中) の 50 ~ 100 マイクロリットルを管腔に注入した。「ソーセージ」を 3 7 °C で 2 4 時間インキュベートし、洗浄後、1 mm² の断片に切断し、³⁵S - メチオニン (500 μ Ci/ml) をメチオニン非含有 L H C - 8 培養液に添加した。3 7 °C で 2 4 時間インキュベートした後、断片を入れた液中のヒト $\alpha 1$ A T の存在を、免疫沈降、ドデシル硫酸ナトリウム/アクリルアミドゲル、およびオートラジオグラフィーにより評価した。結果を図 3 B に示す。レーン 1 - 非感染細胞; レーン 2 - A d - $\alpha 1$ A T に感染させた細胞; レーン 3 - レーン 2 と同様であるが、ラベルしていないヒト $\alpha 1$ A T に感染させた抗体を添加 (抗体の特異性を調べるため)。5 2 k D a のヒト $\alpha 1$ A T を矢印で示す。

実験例 1

T 8 4 ヒト結腸癌細胞 in vitro

表 1

組換えアデノウイルス A d - $\alpha 1$ A T に感染させたヒト T 8 4 結腸癌細胞株によるヒト $\alpha 1$ - アンチトリプシン分泌の活性

| 感染 ¹ | 24時間中の $\alpha 1$ A T の分泌量 (μ g) ² | | 先効と基底外側とのコンパートメントにおける $\alpha 1$ A T の比 |
|----------------------|--|------|---|
| | 先効 | 基底外側 | |
| なし | 0 | 0 | --- |
| 5×10^4 | 3.54 | 0.89 | 3.98 |
| 10^{10} | 7.42 | 1.58 | 4.69 |
| 2.5×10^{10} | 8.89 | 2.05 | 4.34 |

¹ 培養液に添加した A d - $\alpha 1$ A T の p f u 値: 全ての細胞は 4.7 cm² 細胞孔板上で堅固な接合部を形成するまで増殖した (細胞抵抗 > 150 ohm/cm²)。

² 酵素結合免疫アッセイ (Heeners HD et al. (1987) *N Engl J Med* 316: 1055-1062) により測定した。

実験例 2

巨腸ラットおよびコottonラット細胞 in vitro

このモデルは、細胞が正常な状態 (T 8 4 モデルのような口癌由来の細胞ではない) にあり、かつ正常な細胞位置にある結腸上皮細胞に組換えアデノウイルスを感染させることができることを示すために使用した。これを行うために、ラット細胞を切除し、洗浄した後、2 ~ 3 cm の区口の両端を縫合して閉じた「ソーセージ」を作成した (図 3)。A d - $\alpha 1$ A T を管腔内に注入した (例えば、生きた組換えアデノウイルスが腸管上皮細胞から放出されるのに相当する)。この「ソーセージ」を培養培地中に 3 7 °C で 2 4 時間置き、2 つの方法で評価した。第一の方法は、細胞を 1 mm² の断片にし、³⁵S - メチオニンを添加して 3 7 °C で 2 4 時間さらに培養を続け、細胞のヒト $\alpha 1$ A T de novo 合成能および分泌能を、免疫沈降、ドデシル硫酸ナトリウム/アクリルアミドゲルおよびオートラジオグラフィーを用いて評価した (この方法の詳細は Rosenfeld M et al. (1991)

このモデルは、ヒト結腸上皮細胞に A d - $\alpha 1$ A T を感染させることができ、感染の結果、ヒト $\alpha 1$ A T が先効面 (すなわち、上皮の基底側) および基底外側面 (すなわち、上皮の血液循環側) に分泌されることを示すために使用した。これを行うために、T 8 4 細胞株を細胞孔板上でコンフルエントになり、堅固な接合部 (tight junction) を形成するまで増殖した (上皮を覆った細胞抵抗 > 150 ohm/cm²)。上皮細胞のついた細胞孔ポリカーボネート皿 (4.7 cm²、孔サイズ 3.0 mm, Transwell Co., コスター, ケンブリッジ, MA) が培養液を入れた 2 つのチャンバーを隔てている (すなわち、in vivo の上皮を模した in vitro システムである)。上のチャンバーは先効面に面し、下のチャンバーは基底外側面に面している。細胞と細胞間の堅固な接合部の結合により上と下とのチャンバーは物理的に隔てられている (先効面が細胞の内側と口側、基底外側面が細胞の外側と (従って、血液循環と) 隣接している in vivo における状況に相当する。図 2 参照)。細胞を 2 % ウシ胎児血清含有 DMEM 培地で 3 7 °C で 1、5 時間、次いでアデノウイルスを添加しない、または A d - $\alpha 1$ A T を添加した (in vivo で起きているように先効面から感染する) 10^6 ウシ胎児血清含有 DMEM 培地で 3 7 °C で 2 4 時間培養した。感染の効率は 3 段階にした [ブランク形成単位 (pfu)、約 1 ml 当たりの感染ウイルス粒子の数: 5×10^4 , 10^{10} , および 2.5×10^{10} pfu/培養液]。培養を止め、酵素結合免疫アッセイ (Heeners HD et al. (1987) *N Engl J Med* 316: 1055-1062) によりヒト $\alpha 1$ - アンチトリプシンの存在を評価した。このデータは、A d - $\alpha 1$ A T 感染によりヒト結腸上皮細胞が $\alpha 1$ A T を分泌し、両方向 (すなわち、先効面と基底外側面) に分泌していることを示すものである。先効面への分泌量と基底外側面への分泌量に対して比較すると、3.98 ~ 4.69 の範囲 (平均 4.34) であった。すなわち、管腔内へ 4.34 分子が分泌されるごとに (これは最終的に in vivo で排出される)、1 分子が管腔内へ分泌される (これは血液循環に入り利用される)。

図 3 B の結果を表 1 に示す。

Science 252: 431-434 を参照)。その結果は、in vitro において非感染ラット細胞はヒト $\alpha 1$ A T を合成、分泌しないが、A d - $\alpha 1$ A T 感染ラット細胞はヒト $\alpha 1$ A T を合成、分泌することを示している (図 3)。

同様の手法を用いてコottonラット細胞を評価した。但し、管腔内に分泌されたヒト $\alpha 1$ A T の定量 (すなわち、先効分泌: このモデルでは基底外側分泌を測定することはできない) には酵素結合免疫アッセイ (ELISA) を使用した。約 10^{10} pfu の A d - $\alpha 1$ A T を in vitro コottonラット細胞「ソーセージ」の管腔内に注入し、感染 4 8 時間後、管腔液を測定したところヒト $\alpha 1$ A T は $3.3 \pm 0.6 \mu$ g/ml であった。

実験例 3

コottonラット細胞 in vivo

このモデルは、生きている動物の in vivo においても本発明のコンセプトが作用することを示すために使用した。2 つのストラテジー (共にコottonラットにおける) を用いた。第一は、通常の麻酔および開腹を行なった後、結腸の一区画を 2 cm 所で結紮し、正常な血圧が当該区画に流れるようにして in vivo 「ソーセージ」を形成した。A d - $\alpha 1$ A T を管腔内に注入し両端を縫合した。この動物を解剖採取せずにおく。4 8 時間後、血漿サンプルを取り E L I S A 法によりヒト $\alpha 1$ A T の存在を評価した。第二は、通常の麻酔および開腹を行なった後、 10^{10} ~ 10^{11} pfu の A d - $\alpha 1$ A T を細胞の管腔内に感染することなく注入した。4 8 時間後、血漿サンプルを取り、E L I S A 法によりヒト $\alpha 1$ A T の存在を評価した。いずれの場合もヒト $\alpha 1$ A T が明らかに存在した。

結果を表 2 に示す。

表2

Ad- α 1ATをin vivoで結腸管腔に投与した48時間後のコッパンラットにおけるヒト α 1-アンチトリプシンの血清濃度

| 状態 | 血清 α 1AT濃度 (ng/ml) ¹⁾ |
|-------------------------|---|
| 健康感染 | 0 |
| 「ソーセージ」感染 ²⁾ | 145 \pm 29 |
| 電接感染 ³⁾ | 74 \pm 9 |

¹⁾ 両端を結紮することにより分離した腸の区間の管腔内にAd- α 1AT (50~100 μ l, 約 10^{11} pfu)を注入した。

²⁾ 「ソーセージ」感染と同様にする(但し、結紮により腸の区間を分離することはない)。

³⁾ 脾臓結合免疫ノアッセイ(Newers MD et al. (1987) *N. Engl. J. Med.* 316: 1055-1062)により測定した。

上記の発明は、発明を明確にしかつ理解させる目的で詳細に説明されているが、当分野の知識を有する者はこの開示を読んで形式および詳細において本発明ならびに添付された請求の範囲の正確な範囲から逸脱することなく種々の変更を行い得ることが認識されるであろう。

アデノウイルス

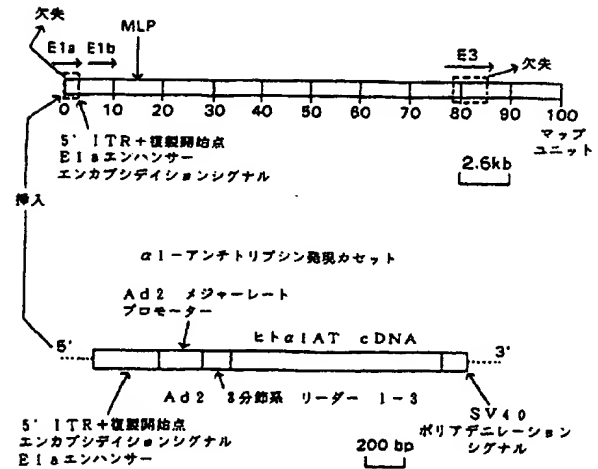


図1

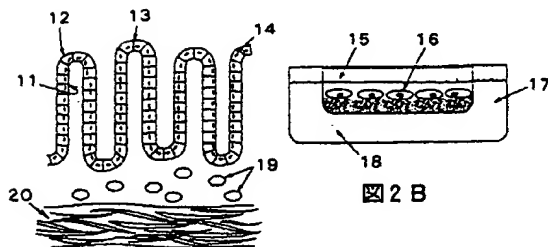


図2 A

図2 B

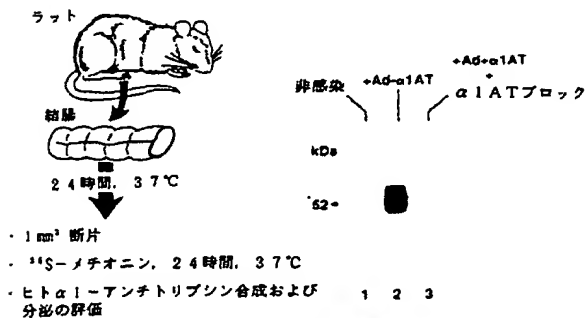


図3 A

図3 B

補正書の写し(翻訳文)提出書(特許法第184条の8)

平成6年2月18日

特許庁長官 殿

1. 特許出題の表示

PCT/US92/07029

2. 発明の名称

アデノウイルスが介在する腎臓管への遺伝子の輸送

3. 特許出題人

住所 アメリカ合衆国、20892-9902
メリーランド州、ベセスダ、ナショナル
インスティテューツ オヴ ヘルス、
オフィス オヴ テクノロジー トランスファー、
ボックス オーティーター(書地なし)

名称 アメリカ合衆国

国籍 アメリカ合衆国

4. 代理人

住所 大阪府大阪市中央区平野町三丁目3番9号
(楠木ビル)
高島国際特許事務所
TEL (06) 227-1156

氏名 井理士(8078) 高島

5. 補正書の提出年月日

1993年8月6日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の翻訳文

請求の範囲の第16~17頁
の差し え用紙の翻訳文

1通

請求の範囲

1. 生物学的に活性なタンパク質をコードするDNA断片を含む増殖欠損性アデノウィルスを、該タンパク質が生産される条件下で個体の胃腸管に投与することを含む、該タンパク質を個体の胃腸管内において生産する方法。
2. 該タンパク質が、治療タンパク質である請求の範囲第1項記載の方法。
3. (補正後) 該タンパク質が、血液凝固因子、脳下垂体ホルモン、ペプチドホルモン、サイトカイン、腫瘍抑制タンパク質、血液学的成長因子、レセプターアゴニストおよびレセプターアンタゴニストからなる群より選ばれた請求の範囲第1項記載の方法。
4. 該タンパク質が、 α 1-アンチトリプシン、エリスロポエチン、第Ⅲ因子、成長ホルモン、腫瘍壊死結合性タンパク質、インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト、インターフェロン γ 、インターフェロン α およびインシュリンからなる群より選ばれた請求の範囲第1項記載の方法。
5. 該アデノウィルスが、Ad- α 1ATである請求の範囲第1項記載の方法。
6. 該アデノウィルスが、腸溶性カプセルに入れて投与される請求の範囲第1項記載の方法。
7. (補正後) 治療タンパク質をコードするDNA断片を含むアデノウィルスを含有し、該アデノウィルスの増殖を促進し得る他のウィルスを含有しない腸溶性カプセル。
8. 生物学的に活性なタンパク質をコードするDNA断片を含む増殖欠損性アデノウィルスの有効量を、該タンパク質が生産される条件下で動物の胃腸管内に投与することを含む、該タンパク質を動物の胃腸管内において生産する方法。
9. 該動物が、哺乳類、鳥類または魚類である請求の範囲第8項記載の方法。
10. 該動物が、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ネコおよびイヌからなる群より選ばれた請求の範囲第9項記載の方法。
11. 該動物がニワトリである請求の範囲第9項記載の方法。
12. (補正後) 治療タンパク質をコードする少なくとも一つのDNA断片を含む増殖欠損性アデノウィルスであって、酸耐性および塩基感受性であるベヒクル

に含まれた該アデノウィルスを含有し(但し、該アデノウィルスの増殖を促進し得る他のウィルスを含有しない)、かつ

飼料上許容される希釈剤、担体または賦形剤を含有する医薬組成物。

13. タンパク質をコードするDNA断片を含む増殖欠損性アデノウィルスの有効量を、該タンパク質が生産され、かつ該タンパク質に対する免疫を生起させる条件下で動物の胃腸管内に投与することを含む、タンパク質に対する免疫を動物に生起させる方法。

国際調査報告

International application No.
PCT/US93/07079

| | |
|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | |
| IPC(1) : A61K 480B; C12N 15/07; 1503; 1547; 1573 US CL : (CPC) 43340.1; 40.3; 40.4; 40.5; 40.6; 40.7; 40.8; 40.9; 40.10; 40.11; 40.12; 40.13; 40.14; 40.15; 40.16; 40.17; 40.18; 40.19; 40.20; 40.21; 40.22; 40.23; 40.24; 40.25; 40.26; 40.27; 40.28; 40.29; 40.30; 40.31; 40.32; 40.33; 40.34; 40.35; 40.36; 40.37; 40.38; 40.39; 40.40; 40.41; 40.42; 40.43; 40.44; 40.45; 40.46; 40.47; 40.48; 40.49; 40.50; 40.51; 40.52; 40.53; 40.54; 40.55; 40.56; 40.57; 40.58; 40.59; 40.60; 40.61; 40.62; 40.63; 40.64; 40.65; 40.66; 40.67; 40.68; 40.69; 40.70; 40.71; 40.72; 40.73; 40.74; 40.75; 40.76; 40.77; 40.78; 40.79; 40.80; 40.81; 40.82; 40.83; 40.84; 40.85; 40.86; 40.87; 40.88; 40.89; 40.90; 40.91; 40.92; 40.93; 40.94; 40.95; 40.96; 40.97; 40.98; 40.99; 40.100; 40.101; 40.102; 40.103; 40.104; 40.105; 40.106; 40.107; 40.108; 40.109; 40.110; 40.111; 40.112; 40.113; 40.114; 40.115; 40.116; 40.117; 40.118; 40.119; 40.120; 40.121; 40.122; 40.123; 40.124; 40.125; 40.126; 40.127; 40.128; 40.129; 40.130; 40.131; 40.132; 40.133; 40.134; 40.135; 40.136; 40.137; 40.138; 40.139; 40.140; 40.141; 40.142; 40.143; 40.144; 40.145; 40.146; 40.147; 40.148; 40.149; 40.150; 40.151; 40.152; 40.153; 40.154; 40.155; 40.156; 40.157; 40.158; 40.159; 40.160; 40.161; 40.162; 40.163; 40.164; 40.165; 40.166; 40.167; 40.168; 40.169; 40.170; 40.171; 40.172; 40.173; 40.174; 40.175; 40.176; 40.177; 40.178; 40.179; 40.180; 40.181; 40.182; 40.183; 40.184; 40.185; 40.186; 40.187; 40.188; 40.189; 40.190; 40.191; 40.192; 40.193; 40.194; 40.195; 40.196; 40.197; 40.198; 40.199; 40.200; 40.201; 40.202; 40.203; 40.204; 40.205; 40.206; 40.207; 40.208; 40.209; 40.210; 40.211; 40.212; 40.213; 40.214; 40.215; 40.216; 40.217; 40.218; 40.219; 40.220; 40.221; 40.222; 40.223; 40.224; 40.225; 40.226; 40.227; 40.228; 40.229; 40.230; 40.231; 40.232; 40.233; 40.234; 40.235; 40.236; 40.237; 40.238; 40.239; 40.240; 40.241; 40.242; 40.243; 40.244; 40.245; 40.246; 40.247; 40.248; 40.249; 40.250; 40.251; 40.252; 40.253; 40.254; 40.255; 40.256; 40.257; 40.258; 40.259; 40.260; 40.261; 40.262; 40.263; 40.264; 40.265; 40.266; 40.267; 40.268; 40.269; 40.270; 40.271; 40.272; 40.273; 40.274; 40.275; 40.276; 40.277; 40.278; 40.279; 40.280; 40.281; 40.282; 40.283; 40.284; 40.285; 40.286; 40.287; 40.288; 40.289; 40.290; 40.291; 40.292; 40.293; 40.294; 40.295; 40.296; 40.297; 40.298; 40.299; 40.300; 40.301; 40.302; 40.303; 40.304; 40.305; 40.306; 40.307; 40.308; 40.309; 40.310; 40.311; 40.312; 40.313; 40.314; 40.315; 40.316; 40.317; 40.318; 40.319; 40.320; 40.321; 40.322; 40.323; 40.324; 40.325; 40.326; 40.327; 40.328; 40.329; 40.330; 40.331; 40.332; 40.333; 40.334; 40.335; 40.336; 40.337; 40.338; 40.339; 40.340; 40.341; 40.342; 40.343; 40.344; 40.345; 40.346; 40.347; 40.348; 40.349; 40.350; 40.351; 40.352; 40.353; 40.354; 40.355; 40.356; 40.357; 40.358; 40.359; 40.360; 40.361; 40.362; 40.363; 40.364; 40.365; 40.366; 40.367; 40.368; 40.369; 40.370; 40.371; 40.372; 40.373; 40.374; 40.375; 40.376; 40.377; 40.378; 40.379; 40.380; 40.381; 40.382; 40.383; 40.384; 40.385; 40.386; 40.387; 40.388; 40.389; 40.390; 40.391; 40.392; 40.393; 40.394; 40.395; 40.396; 40.397; 40.398; 40.399; 40.400; 40.401; 40.402; 40.403; 40.404; 40.405; 40.406; 40.407; 40.408; 40.409; 40.410; 40.411; 40.412; 40.413; 40.414; 40.415; 40.416; 40.417; 40.418; 40.419; 40.420; 40.421; 40.422; 40.423; 40.424; 40.425; 40.426; 40.427; 40.428; 40.429; 40.430; 40.431; 40.432; 40.433; 40.434; 40.435; 40.436; 40.437; 40.438; 40.439; 40.440; 40.441; 40.442; 40.443; 40.444; 40.445; 40.446; 40.447; 40.448; 40.449; 40.450; 40.451; 40.452; 40.453; 40.454; 40.455; 40.456; 40.457; 40.458; 40.459; 40.460; 40.461; 40.462; 40.463; 40.464; 40.465; 40.466; 40.467; 40.468; 40.469; 40.470; 40.471; 40.472; 40.473; 40.474; 40.475; 40.476; 40.477; 40.478; 40.479; 40.480; 40.481; 40.482; 40.483; 40.484; 40.485; 40.486; 40.487; 40.488; 40.489; 40.490; 40.491; 40.492; 40.493; 40.494; 40.495; 40.496; 40.497; 40.498; 40.499; 40.500; 40.501; 40.502; 40.503; 40.504; 40.505; 40.506; 40.507; 40.508; 40.509; 40.510; 40.511; 40.512; 40.513; 40.514; 40.515; 40.516; 40.517; 40.518; 40.519; 40.520; 40.521; 40.522; 40.523; 40.524; 40.525; 40.526; 40.527; 40.528; 40.529; 40.530; 40.531; 40.532; 40.533; 40.534; 40.535; 40.536; 40.537; 40.538; 40.539; 40.540; 40.541; 40.542; 40.543; 40.544; 40.545; 40.546; 40.547; 40.548; 40.549; 40.550; 40.551; 40.552; 40.553; 40.554; 40.555; 40.556; 40.557; 40.558; 40.559; 40.560; 40.561; 40.562; 40.563; 40.564; 40.565; 40.566; 40.567; 40.568; 40.569; 40.570; 40.571; 40.572; 40.573; 40.574; 40.575; 40.576; 40.577; 40.578; 40.579; 40.580; 40.581; 40.582; 40.583; 40.584; 40.585; 40.586; 40.587; 40.588; 40.589; 40.590; 40.591; 40.592; 40.593; 40.594; 40.595; 40.596; 40.597; 40.598; 40.599; 40.600; 40.601; 40.602; 40.603; 40.604; 40.605; 40.606; 40.607; 40.608; 40.609; 40.610; 40.611; 40.612; 40.613; 40.614; 40.615; 40.616; 40.617; 40.618; 40.619; 40.620; 40.621; 40.622; 40.623; 40.624; 40.625; 40.626; 40.627; 40.628; 40.629; 40.630; 40.631; 40.632; 40.633; 40.634; 40.635; 40.636; 40.637; 40.638; 40.639; 40.640; 40.641; 40.642; 40.643; 40.644; 40.645; 40.646; 40.647; 40.648; 40.649; 40.650; 40.651; 40.652; 40.653; 40.654; 40.655; 40.656; 40.657; 40.658; 40.659; 40.660; 40.661; 40.662; 40.663; 40.664; 40.665; 40.666; 40.667; 40.668; 40.669; 40.670; 40.671; 40.672; 40.673; 40.674; 40.675; 40.676; 40.677; 40.678; 40.679; 40.680; 40.681; 40.682; 40.683; 40.684; 40.685; 40.686; 40.687; 40.688; 40.689; 40.690; 40.691; 40.692; 40.693; 40.694; 40.695; 40.696; 40.697; 40.698; 40.699; 40.700; 40.701; 40.702; 40.703; 40.704; 40.705; 40.706; 40.707; 40.708; 40.709; 40.710; 40.711; 40.712; 40.713; 40.714; 40.715; 40.716; 40.717; 40.718; 40.719; 40.720; 40.721; 40.722; 40.723; 40.724; 40.725; 40.726; 40.727; 40.728; 40.729; 40.730; 40.731; 40.732; 40.733; 40.734; 40.735; 40.736; 40.737; 40.738; 40.739; 40.740; 40.741; 40.742; 40.743; 40.744; 40.745; 40.746; 40.747; 40.748; 40.749; 40.750; 40.751; 40.752; 40.753; 40.754; 40.755; 40.756; 40.757; 40.758; 40.759; 40.760; 40.761; 40.762; 40.763; 40.764; 40.765; 40.766; 40.767; 40.768; 40.769; 40.770; 40.771; 40.772; 40.773; 40.774; 40.775; 40.776; 40.777; 40.778; 40.779; 40.780; 40.781; 40.782; 40.783; 40.784; 40.785; 40.786; 40.787; 40.788; 40.789; 40.790; 40.791; 40.792; 40.793; 40.794; 40.795; 40.796; 40.797; 40.798; 40.799; 40.800; 40.801; 40.802; 40.803; 40.804; 40.805; 40.806; 40.807; 40.808; 40.809; 40.810; 40.811; 40.812; 40.813; 40.814; 40.815; 40.816; 40.817; 40.818; 40.819; 40.820; 40.821; 40.822; 40.823; 40.824; 40.825; 40.826; 40.827; 40.828; 40.829; 40.830; 40.831; 40.832; 40.833; 40.834; 40.835; 40.836; 40.837; 40.838; 40.839; 40.840; 40.841; 40.842; 40.843; 40.844; 40.845; 40.846; 40.847; 40.848; 40.849; 40.850; 40.851; 40.852; 40.853; 40.854; 40.855; 40.856; 40.857; 40.858; 40.859; 40.860; 40.861; 40.862; 40.863; 40.864; 40.865; 40.866; 40.867; 40.868; 40.869; 40.870; 40.871; 40.872; 40.873; 40.874; 40.875; 40.876; 40.877; 40.878; 40.879; 40.880; 40.881; 40.882; 40.883; 40.884; 40.885; 40.886; 40.887; 40.888; 40.889; 40.890; 40.891; 40.892; 40.893; 40.894; 40.895; 40.896; 40.897; 40.898; 40.899; 40.900; 40.901; 40.902; 40.903; 40.904; 40.905; 40.906; 40.907; 40.908; 40.909; 40.910; 40.911; 40.912; 40.913; 40.914; 40.915; 40.916; 40.917; 40.918; 40.919; 40.920; 40.921; 40.922; 40.923; 40.924; 40.925; 40.926; 40.927; 40.928; 40.929; 40.930; 40.931; 40.932; 40.933; 40.934; 40.935; 40.936; 40.937; 40.938; 40.939; 40.940; 40.941; 40.942; 40.943; 40.944; 40.945; 40.946; 40.947; 40.948; 40.949; 40.950; 40.951; 40.952; 40.953; 40.954; 40.955; 40.956; 40.957; 40.958; 40.959; 40.960; 40.961; 40.962; 40.963; 40.964; 40.965; 40.966; 40.967; 40.968; 40.969; 40.970; 40.971; 40.972; 40.973; 40.974; 40.975; 40.976; 40.977; 40.978; 40.979; 40.980; 40.981; 40.982; 40.983; 40.984; 40.985; 40.986; 40.987; 40.988; 40.989; 40.990; 40.991; 40.992; 40.993; 40.994; 40.995; 40.996; 40.997; 40.998; 40.999; 40.1000; 40.1001; 40.1002; 40.1003; 40.1004; 40.1005; 40.1006; 40.1007; 40.1008; 40.1009; 40.1010; 40.1011; 40.1012; 40.1013; 40.1014; 40.1015; 40.1016; 40.1017; 40.1018; 40.1019; 40.1020; 40.1021; 40.1022; 40.1023; 40.1024; 40.1025; 40.1026; 40.1027; 40.1028; 40.1029; 40.1030; 40.1031; 40.1032; 40.1033; 40.1034; 40.1035; 40.1036; 40.1037; 40.1038; 40.1039; 40.1040; 40.1041; 40.1042; 40.1043; 40.1044; 40.1045; 40.1046; 40.1047; 40.1048; 40.1049; 40.1050; 40.1051; 40.1052; 40.1053; 40.1054; 40.1055; 40.1056; 40.1057; 40.1058; 40.1059; 40.1060; 40.1061; 40.1062; 40.1063; 40.1064; 40.1065; 40.1066; 40.1067; 40.1068; 40.1069; 40.1070; 40.1071; 40.1072; 40.1073; 40.1074; 40.1075; 40.1076; 40.1077; 40.1078; 40.1079; 40.1080; 40.1081; 40.1082; 40.1083; 40.1084; 40.1085; 40.1086; 40.1087; 40.1088; 40.1089; 40.1090; 40.1091; 40.1092; 40.1093; 40.1094; 40.1095; 40.1096; 40.1097; 40.1098; 40.1099; 40.1100; 40.1101; 40.1102; 40.1103; 40.1104; 40.1105; 40.1106; 40.1107; 40.1108; 40.1109; 40.1110; 40.1111; 40.1112; 40.1113; 40.1114; 40.1115; 40.1116; 40.1117; 40.1118; 40.1119; 40.1120; 40.1121; 40.1122; 40.1123; 40.1124; 40.1125; 40.1126; 40.1127; 40.1128; 40.1129; 40.1130; 40.1131; 40.1132; 40.1133; 40.1134; 40.1135; 40.1136; 40.1137; 40.1138; 40.1139; 40.1140; 40.1141; 40.1142; 40.1143; 40.1144; 40.1145; 40.1146; 40.1147; 40.1148; 40.1149; 40.1150; 40.1151; 40.1152; 40.1153; 40.1154; 40.1155; 40.1156; 40.1157; 40.1158; 40.1159; 40.1160; 40.1161; 40.1162; 40.1163; 40.1164; 40.1165; 40.1166; 40.1167; 40.1168; 40.1169; 40.1170; 40.1171; 40.1172; 40.1173; 40.1174; 40.1175; 40.1176; 40.1177; 40.1178; 40.1179; 40.1180; 40.1181; 40.1182; 40.1183; 40.1184; 40.1185; 40.1186; 40.1187; 40.1188; 40.1189; 40.1190; 40.1191; 40.1192; 40.1193; 40.1194; 40.1195; 40.1196; 40.1197; 40.1198; 40.1199; 40.1200; 40.1201; 40.1202; 40.1203; 40.1204; 40.1205; 40.1206; 40.1207; 40.1208; 40.1209; 40.1210; 40.1211; 40.1212; 40.1213; 40.1214; 40.1215; 40.1216; 40.1217; 40.1218; 40.1219; 40.1220; 40.1221; 40.1222; 40.1223; 40.1224; 40.1225; 40.1226; 40.1227; 40.1228; 40.1229; 40.1230; 40.1231; 40.1232; 40.1233; 40.1234; 40.1235; 40.1236; 40.1237; 40.1238; 40.1239; 40.1240; 40.1241; 40.1242; 40.1243; 40.1244; 40.1245; 40.1246; 40.1247; 40.1248; 40.1249; 40.1250; 40.1251; 40.1252; 40.1253; 40.1254; 40.1255; 40.1256; 40.1257; 40.1258; 40.1259; 40.1260; 40.1261; 40.1262; 40.1263; 40.1264; 40.1265; 40.1266; 40.1267; 40.1268; 40.1269; 40.1270; 40.1271; 40.1272; 40.1273; 40.1274; 40.1275; 40.1276; 40.1277; 40.1278; 40.1279; 40.1280; 40.1281; 40.1282; 40.1283; 40.1284; 40.1285; 40.1286; 40.1287; 40.1288; 40.1289; 40.1290; 40.1291; 40.1292; 40.1293; 40.1294; 40.1295; 40.1296; 40.1297; 40.1298; 40.1299; 40.1300; 40.1301; 40.1302; 40.1303; 40.1304; 40.1305; 40.1306; 40.1307; 40.1308; 40.1309; 40.1310; 40.1311; 40.1312; 40.1313; 40.1314; 40.1315; 40.1316; 40.1317; 40.1318; 40.1319; 40.1320; 40.1321; 40.1322; 40.1323; 40.1324; 40.1325; 40.1326; 40.1327; 40.1328; 40.1329; 40.1330; 40.1331; 40.1332; 40.1333; 40.1334; 40.1335; 40.1336; 40.1337; 40.1338; 40.1339; 40.1340; 40.1341; 40.1342; 40.1343; 40.1344; 40.1345; 40.1346; 40.1347; 40.1348; 40.1349; 40.1350; 40.1351; 40.1352; 40.1353; 40.1354; 40.1355; 40.1356; 40.1357; 40.1358; 40.1359; 40.1360; 40.1361; 40.1362; 40.1363; 40.1364; 40.1365; 40.1366 | |

フロントページの続き

| | | | |
|---------------------------|------|----------|-----|
| (51)Int. Cl. ⁵ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I |
| A 6 1 K 48/00 | | 8314 -4C | |
| C 1 2 N 15/87 | | | |
| // C 1 2 N 15/15 | | | |
| (C 1 2 P 21/02 | | | |
| C 1 2 R 1:91) | | | |